

COM. EP 0122 028

4

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—220199

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 Q 1/00  
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号  
8213—4B  
Z 8305—2G

⑬ 公開 昭和59年(1984)12月11日

発明の数 4  
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ 吸収剤表面上の酵素基質を含む検査用品及び  
それを用いる比色検査方法

⑯ 特 願 昭59—44778

⑰ 出 願 昭59(1984)3月7日

優先権主張 ⑱ 1983年3月7日 ⑲ 米国(US)  
⑳ 472664

㉑ 発 明 者 ビーター・クウォック・チ・チ  
ユン  
アメリカ合衆国カリフォルニア  
州94080サウス・サンフランシ  
スコ・アダムス・コート2566

㉒ 発 明 者 アルバート・エン・ユーアン・  
チユウ  
アメリカ合衆国カリフォルニア  
州94402サン・マテオ・メイブ  
ル・ストリート819

㉓ 出 願 人 イー・ワイ・ラボラトリース・  
インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国カリフォルニア  
州94401サン・マテオ・ノース  
・アムフレッツ・ブルヴァー  
ド127

㉔ 代 理 人 弁理士 中村稔 外3名

# 明 細 書

1 発明の名称 吸収剤表面上の酵素基質を含む検査  
用品及びそれを用いる比色検査  
方法

## 2 特許請求の範囲

1) 生物学的に導かれた試料中の、予想される酵  
素を含む物質の比色検査方法において、

予想される酵素を含む可能性ある物質を含有  
している試料を、その予想酵素含有物質中の該  
酵素に対する基質を吸収して含む吸収剤表面に  
吸収させ、その場合に基質が酵素の存在下に恒  
温保持されるだけで特定の色を生じうるもので  
あり、酵素がオキシダーゼ、グリコシダーゼ、  
エステラーゼ、ホスファターゼ、アリアルサル  
ファターゼ、ペーダーラクターゼ、DNA分  
解酵素、イミノペプチダーゼ及びアミノペプチ  
ダーゼからなる群から選ばれるようにし、及び  
該吸収の後にその吸収剤表面を恒温保持する各  
工程を包含することを特徴とする上記の方法。

2) 生物学的に導かれた試料中に含まれる少くと

も第一及び第二の酵素を比色検査する方法にお  
いて、

第一及び第二の酵素を含む可能性ある試料を、  
少くとも第一及び第二の基質を吸収して含有す  
る吸収剤表面に吸収させ、その際第一の基質が  
第一の酵素の存在下に恒温保持されて第一の色  
を生じうるものであり、第二の基質が第二の酵  
素の存在下に恒温保持されて第二の色を生じう  
るものであるようにすることを特徴とする上記  
の方法。

3) 比色検査のための診断用品の製造方法にお  
いて、

(a) 生物学的に導かれた試料中の予想酵素含有  
物質の酵素に対する基質を吸収剤表面上に吸  
収させ、その場合に基質が溶媒中に含まれ、  
その酵素の存在下に恒温保持するだけで特定  
の色を生じうる該基質であり、酵素がオキシ  
ダーゼ、グリコシダーゼ、エステラーゼ、ホ  
スファターゼ、アリアルサルファターゼ、ペ  
ーダーラクターゼ、DNA分解酵素、イミ

ノペプチダーゼ、及びアミノペプチダーゼからなる群から選ばれるようにする工程、及び  
 (b) その吸収剤表面を乾燥する工程  
 を包含することを特徴とする上記の方法。

4) 生物学的に導かれた試料中の予想酵素含有物質を比色検査するための診断用品において、

予想酵素含有物質の酵素に特異的な基質をその上に吸収する吸収剤表面からなり、その場合に基質が酵素の存在下に恒温保持されるだけで特定の色を生じうるものであり、酵素がオキシダーゼ、グリコシダーゼ、エステラーゼ、ホスファターゼ、アリアルサルファターゼ、ペーテラクターゼ、DNA分解酵素、イミノペプチダーゼ及びアミノペプチダーゼからなる群から選ばれることを特徴とする上記の診断用品。

### 3 発明の詳細な説明

本発明は生物学的に導かれた試料中の酵素活性の比色検出、更に詳細にはその酵素に特異的な基質を用いた、バクテリアのような微生物における酵素活性の検出に関する。

バクテリア及びその他の微生物或は生物学的に導かれた材料(例えば血清、尿、表面液(surface fluid)、滲出液、或は培養培地又は培養液から得たもの)中の物質の単純で迅速な定量は診断における重要な方法である。医師又は熟練した技師が独立した研究施設で作業することなく診断をなしうるような検査法を提供することは特に有益である。成種の基質はバクテリア等の酵素と特異的に反応し、かような酵素と恒温保持すると無色から有色型へ、或は一つの色から他の色へ変色が起ることはよく知られている。例えば酵母微生物の推定同定法としてウレアーゼに対する試験が記載されている[Zimmer, B.L. et al., J. Clin. Microbiol., 第10巻380頁/1979年]。この出版物は尿素と指示薬との綿付アプリケーションへの吸収とそれ

に続く乾燥とを記載している。その乾燥後にウレアーゼを含むと予想される被験生物のコロニーとアプリケーションとを共に恒温保持する。この恒温保持されたアプリケーションは試験管内に入れられウレアーゼの存在下に尿素の加水分解によつて溶液のpHが低下すると黄色から紫色に変化する。

本発明によれば生物学的に導かれた試料中の酵素含有物質の1種又は複数種の酵素の比色検査法が提供される。単一の酵素の検査のための診断用品は先ず成種の酵素に対する基質を吸収剤表面上に吸収させることによつて製造される。特に有効な基質はオキシダーゼ、グリコシダーゼ、エステラーゼ、ホスファターゼ、アリアルサルファターゼ、ペーテラクターゼ、DNA分解酵素、イミノペプチダーゼ及びアミノペプチダーゼに対する基質である。好適な表面は吸収剤綿球の表面である。綿球表面は乾燥され、比色検査に用いられるようになっている。

単一の酵素の定量の態に恐らくは予想される酵素を含む物質を包含する試料は吸収剤表面上に吸

収される。次にその吸収剤表面を好適には湿つた雰囲気中で恒温保持する。恒温保持後の表面上の色の存在又は変化は試料が予想される物質を含有することの陽性表示である。成る場合にはジアゾ染料のような補足的試薬が十分な発色のために要求される。アミノペプチダーゼ酵素に対して特に迅速で、従つて有効な基質は4位又は6位又はその両位を電子供与基で置換されたガンマグルタミンナフチルアミドである。

この系は単一の吸収剤表面を用いて、生物学的に導かれた単一の試料中の複数種の酵素の同時検出に適用され得る。即ち少くとも第1及び第2の基質がその吸収剤表面上に吸収される。第1の基質は第1の酵素の存在下に恒温保持されると第1の色を生じうるし、一方、第2の基質は第2の酵素の存在下に恒温保持されると第2の色を生じうる。第1の色は第2の色と識別されるように選ばれ、第1及び第2の色の組合せは第1或は第2の色の何れからも識別される第3の色を生じる。従つて恒温保持により第1、第2又は第3の色への

変化が起れば試料がそれぞれ第1の酵素、第2の酵素又は両方の酵素を含有していることの陽性の表示である。基質自身の色への転化、酵素の存在によつて基質が転化された後にジアゾ染料発色剤と共に適当な型へ転化されることによつて呈色は達成される。

本発明は尿、血清、血漿、滲出液又は耳、咽喉或は外皮、性器のような体表面上の液体又は培養地又は培養液から得られるような生物学的に導かれた試料中の1種又はそれ以上の予想される酵素を含む物質の比色検査に関する。要約すると本発明の比色検査に用いられる診断用品は次のように製造される。予想される酵素を含む物質中に検出されるべき各酵素に対する1種又はそれ以上の基質を吸収剤表面に吸収させる。特に有効で便利な吸収剤表面は綿のような取っ手(ハンドル)に付着された多孔性綿球の表面からなる。綿球は木綿、ポリエステル、ガラスセニファイラメント等のようなあらゆる適正な吸収剤材料から製造される。典型的には基質は吸収に先立つて水形液又

は有機溶液中に溶解される。好適には1 $\mu$ の基質を1 $\mu$ lの水性、緩衝化、或はアルコール性の溶液に含む0.05~1.0 $\mu$ lの溶液を各綿球に対して使用しうる。吸収剤表面は好適にはこれを比色検査に使用する前に例えば空気中で乾燥する。

典型的な例では比色検査における基質含有吸収剤表面の使用法は次のとおりである。或種のバクテリアを含むと予想される試料と綿球とを接触させる。好適には試料を吸収剤表面と接触させる前にバクテリアの濃度を増すために適正な増地又は培養液中で該試料をまず恒温保持、即ち培養する。

バクテリアの恒温保持後に吸収剤表面をバクテリアと接触させ、湿った雰囲気下のような適当な条件下で、典型的には単離された領域内で、恒温保持する。吸収剤表面の色が無色から有色へ、或は1つの色から他の色へ特定な方法で変化したらこれは試料がその基質に特異的な酵素をもつたバクテリアを含んでいることの陽性表示である。

吸収剤表面への吸収が可能で、予想される酵素を含む物質の酵素部分の存在下に恒温保持するだ

けで特定の色を生じうる全ての基質が使用されうる。或る場合には基質自身が酵素の存在下に1つの色から他の色へ、或は無色型から有色型へ転化される。その他の場合には比色検出に先立つて、ジアゾ染料とカップルされる基質の型に該基質が酵素によつて転化される。

適正な酵素-基質系は第1表に示される。

第1表

酵 素	基 質
1. グリコシダーゼ:	(a) 発色部分
(グリコシド結合を加水分解する酵素類)	$\alpha$ 及び $\beta$ 6-プロモ-ナフチル、 $\alpha$ 及び $\beta$ ナフチル、 $\alpha$ 及び $\beta$ 4-メトキシナフチル、 p-ニトロフェノール、 (例えば $\alpha$ -マンノシダーゼ 5-プロモ-4-クロロ-3- $\beta$ -ガラクトシダーゼ インドリル、 -ゼ プロモテモールフタレイン、 $\alpha$ -グルコシダーゼ) フェノールフタレイン、 4-メチルウムベリフェリル、

又はフルオレフセイン

(b) 脂肪酵素部分

類: 右及び左旋性、下記諸物質の $\alpha$ 及び $\beta$ 割掌体:

(I) グリコシド (例えば $\alpha$ -D-グルコピラノシド)、

(II) アミノグリコシド (例えばD-ガラクトサミン)、

(III) アミノ-アシル-グリコシド (例えばN-アセチル-D-グルコサミン)、

(IV) 酸 [アルドン酸、アルダル酸 (aldaric acid) 及びクロン酸]

(例えば

D-グルコン酸、

D-グルカル酸、

D-グルクロン酸) 又は

(V) シアル酸 (例えばN-アセチル-ノイラミン酸)

2 エステラーゼ：  
(エステル結合  
を加水分解する  
酵素族)

## (a) 発色部分

$\alpha$  及び  $\beta$  6-プロモ-ナフタル、  
 $\alpha$  及び  $\beta$  ナフタル、  
 $\alpha$  及び  $\beta$  4-メトキシナフタル、  
p-ニトロフェノール、  
o-ニトロフェノール、  
5-プロモ-4-クロロ-3-イ  
ンドリル、  
プロモチモールフタレイン、  
フェノールフタレイン、  
4-メチルウムベリフェリル、又  
はフルオレツセイン

## (b) カルボキシレート部分

種々の炭素数の、飽和及び(又は)  
不飽和の、分岐及び(又は)直鎖  
のカルボン酸及びそれらの塩：  
(例えばアテレート、アセテート、  
カブレート、カプロエート、カプ  
リレート、ミリステート、ラウレ  
ート、ペルミテート、オレエート、

3 ホスファターゼ：  
(例えば酸性ホス  
ファターゼ及びア  
ルカリ性ホスファ  
ターゼ)

パレレート等。)

ホスファートの発色部分

$\alpha$  及び  $\beta$  6-プロモ-ナフタル、  
 $\alpha$  及び  $\beta$  ナフタル、  
 $\alpha$  及び  $\beta$  4-メトキシナフタル、  
p-ニトロフェノール、  
o-ニトロフェノール、  
5-プロモ-4-クロロ-3-イ  
ンドリル、  
プロモチモールフタレイン、  
フェノールフタレイン、  
4-メチルウムベリフェリル、又  
はフルオレツセイン

4 アリールサルファ  
ターゼ：

サルファートの発色部分

$\alpha$  及び  $\beta$  6-プロモ-ナフタル、  
 $\alpha$  及び  $\beta$  ナフタル、  
 $\alpha$  及び  $\beta$  4-メトキシナフタル、  
p-ニトロフェノール、  
o-ニトロフェノール、  
5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル、

5 アミノペプチダーゼ

及びイミノペプチダ  
ーゼ：

(アミド結合を加水分解  
し、その特異性がアミド  
結合を直接するアミノ酸  
によつて支配されている

酵素族、例えば $\alpha$ -グル  
タミルアミノペプチダー  
ゼ)

6 ペプターラクタマー  
ゼ：

プロモチモールフタレイン、  
フェノールフタレイン、  
4-メチルウムベリフェリル、  
又はフルオレツセイン

## (a) 発色部分

$\alpha$  及び  $\beta$  アルコキシル-ナ  
フタル誘導体及び  
 $\alpha$  及び  $\beta$  ナフタル又は $\gamma$ -  
アミド-4-メチルタマリ  
ン

## (b) ペプチド部分

アミノ酸及びジペプチド及  
びトリペプチド

( $\gamma$ -(チエニル-2-アセタ  
ミド)-3-(2-(4-N,N-ジ  
メチルアミノフェニルアゾ)ピ  
リジニウムメチル)-3-セフ  
エム-4-カルボン酸)

7 オキシダーゼ：

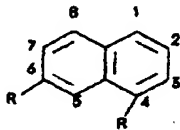
N,N-ジメチル-p-フェニレ  
ンジアミンモノヒドロクロリド

8 DNA 分解酵素：

5-プロモ-4-クロロ-3-  
インドイル-チミジン-3'-ホ  
スファート

第1表において成種の酵素-基質系はジアゾ  
染料とのカップリングを必要とする。この系は  
ナフトール基質、イミノペプチダーゼ、及びア  
ミノペプチダーゼとそれらの酵素とを包含する。  
アミノ酸ナフタルアミドはアミノペプチダーゼ  
に対する既知の基質である。例えば $\gamma$ -グルタ  
ミル-ナフタルアミドは $\gamma$ -グルタミルアミノ  
ペプチダーゼの特異的な基質であることは周知  
である。従つて一般にこの特異的なアミノ酸ナ  
フタルアミドは対応するアミノペプチダーゼに  
対する基質を形成する。同時出願の Albert E.  
Chu 及び Peter K. Chun の "Microorganism  
Detection Test (微生物の検出方法)" と題する  
出願明細書中に述べられているように上記の類  
の慣用的な基質はジアゾ染料とのカップリング

によつて比色検出するためには相当に長い恒温保持期間を必要とする。引例としてここに紹介されている上記の同時出願明細書中に述べられているような方法で本発明の吸収剤表面法についてもこのカップリング反応を迅速化することが好適である。要するにこの迅速化は次の構造式において4位、6位又はその両位に電子供与基R(例えばメトキシのようなアルコキシ基、ヒドロキシ基、又はヘロゲン)を置換することによつて著しく増大される。



この型の特異的な酵素-基質系及び基質-酵素反応生成物を着色型に転化するために適正に使用されるジアゾカップリング染料もまた引例としてここに紹介されている上述の同時出願明細書中に述べられている。

本発明は綿球のような単一の吸収剤表面を用い

て単一の試料中の複数種の酵素の検出に適用される。この系の試験には生物学的に源かれた試料中に含まれる第1及び第2の酵素に対する試験が含まれる。この場合に少くとも第1及び第2の基質がまず吸収剤表面に吸収される。第1の基質は第1の酵素の存在下で恒温保持されると第1の色を生じうるが、他方において第2の基質は第2の酵素の存在下に恒温保持されると第2の色を生じうる。第1の色は第2の色から識別されるように選択され、第1の色と第2の色との組合せは第3の色を生成し、これもまた第1又は第2の色から識別される。この試験において吸収剤表面は試料と接触し、次に恒温保持される。4つの可能性の中に1つの可能性が存在する。即ち色の転化なし、第1の色への転化、第2の色への転化、或は第3の色への転化。各可能性は異なる酵素活性状態の推定される証拠である。もし色の転化がなければ恐らく第1の酵素も第2の酵素も存在しないのである。もし恒温保持後に第1の色があれば恐らく唯一の酵素活性は第1の酵素によるものである。も

し第2の色が存在すれば恐らく第2の酵素活性のみが存在するのであり、一方第3の色が恒温保持後にあれば恐らく両方の酵素が存在する。特定例として、両方の基質のいずれにも酵素が存在しない場合には無色で、第1の酵素が存在して第2の酵素が存在しなければ黄色に着色し、第2の酵素が存在して第1の酵素が存在しなければ青色に着色する例をあげることが出来る。この場合に無色の最終生成物は酵素活性の存在しないことを示し、黄色は第1の酵素活性の存在を示し、青色は第2の酵素活性の存在を示し、緑色は第1及び第2の両方の酵素の酵素活性の存在を示す。

本発明の上述の複数種の酵素の検出については多岐の変更が可能である。例えば基質の1つは酵素の存在下に着色型に直ちに転化可能であり、他方、第2の基質はジアゾ染料とのカップリングによつて活性化されない限り無色であるようにもなしうる。直接転化基質とジアゾカップリング基質との組合せは単一の吸収剤表面上の3種又はそれ以上の多岐種の基質を用いて3種又はそれ以上の酵素の検出のための迅速な方法を提供する。即ち例えば第1の基質はp-ニトロフェニルβ-D-ガラクトピラノシドのような無色から黄色に直接転化する型の基質であり、第2の基質は5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルβ-D-グルクロニドのように無色から青色に直接転化する型であり、第3の基質は例えばジアゾ染料の存在下に無色から赤色に転化するアミノ酸ナフタルアミドのようにジアゾ染料カップリングを必要とする基質であるようになしうる。この場合に最初の恒温保持はジアゾ染料カプラーの不在下に行われる。表面が無色であればこれは第1及び第2の基質に対応する

酵素が存在しないことを示す。そこでゾアゾ染料を添加し、紫色が出ればこれは第3の酵素の存在の陽性表示である。ゾアゾ染料添加前に黄色が出現すればこれは第1の基質に対応する酵素の存在の証拠である。ゾアゾ染料と発色させて黄色になれば同様に第3の基質に対する酵素の存在の証拠である。同様に最初に青色が出れば第2の酵素の存在の証拠であり、紫色は同様に第3の酵素の存在の証拠となる。最後に黄色は第1及び第2の両方の酵素の存在の証拠であり、ゾアゾ染料との発色後に赤と赤との複合した色が出れば同様に第3の酵素の存在の証拠となる。

上述の型の基質-酵素系を変更して用いることにより本発明の系は固体吸収剤表面上での種々な基質-酵素系の酵素試験に適用可能であることは上述したところから明らかである。綿球のような単一の吸収剤表面上での複数種の酵素活性を試験する能力は多数の独特な利点を与える。例えばしばしば限られた量の試料しか試験に使えないことがあり、従つて最少の試料で複数種の試験を行う能力は明

瞭な利点である。更に試験が保存され、試験時間が最少化される。

本発明を例示する特定例は次のとおりである。

例 1

PADAC (7-(チエニル-2-アセタミド)-3-(2-(4-N, N-ジメチルアミノフェニル)ピリジニウムメチル)-3-セフェム-4-カルボン酸)は紫色の基質であつてβ-ラクタマーゼによつて作用されると黄色に変化する。この基質を0.1mg/ml含有する0.1mlの水溶液で綿球を含浸させてから綿球を風乾する。培養プレートからナイセリアゴノレ (*Neisseria gonorrhoeae*) と考えられるバクテリアコロニーの検出にこの綿球を使用する。綿球を2滴の水で湿らせ、37℃のインキュベーター中で10〜15分間恒温保存する。紫色から黄色への変化はβ-ラクタマーゼの存在を示し、従つてこのナイセリアゴノレはβ-ラクタマーゼ生産株であることを示す。色の変化が起らなければこのナイセリアゴノレはβ-ラクタマーゼ非生産株である。

例 2

綿球を1mg/mlのO-ニトロフェニル-O-ガラクトピラノシド及び1mg/mlのγ-グルタミル4-メトキシ-β-ナフチルアミドを含有する0.1mlの0.05Mリン緩衝液で含浸させてからこの綿球を風乾する。

この綿球をタイヤーマーチン (Thayer Martin) 培地上に生育し、試験によつてグラム陰性の球菌でオキシダーゼ陽性の微生物であることのわかつている少数の形態学的に類似した培養物の検出に使用する。

綿球を2滴の水で湿らせ37℃のインキュベーター中で10分間恒温保持する。もともと無色である綿球の色について全ての色の変化を検査する。黄色はβ-ガラクトシダーゼの存在、従つてナイセリア (*Neisseria lactamica*) の存在を示す；色の変化がなければナイセリアゴノレ、ナイセリアメニンギチス (*Neisseria meningitidis*) 又はブランヘメラカタリス (*Branhamella catarrhalis*) の存在の可能性を示す。この時点で色の変

化がなければ1滴のファストガーネット (Fast garnet) GBC塩 (ゾアゾ染料) 溶液 (1mg/ml水溶液) をその綿球に添加する。紫色への色の変化はγ-グルタミルアミノペプチダーゼの存在、従つてナイセリアメニンギチスの存在を示す。ファストガーネットGBC添加後に色の変化がなければナイセリアゴノレ又はブランヘメラカタリスの存在可能性を示す。

例 3

腸内菌科 (family Enterobacteriaceae) はエシエリキア (*Escherichia*)、シゲラ (*Shigella*)、サルモネラ (*Salmonella*)、アリゾナ (*Arizona*)、シトロバクター (*Citrobacter*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、エンテロバクター (*Enterobacter*)、セラチア (*Serratia*)、プロテウス (*Proteus*) 及びプロビデンス (*Providencia*) の各属を包含する。この群は3種の酵素活性の存在による生化学的反応によつて大きく分類される：

(1) シトロバクター、クレブシエラ、エンテロバクター、若干のセラチア、エシエリキア及びアリ

ゾナは $\beta$ -ガラクトシダーゼを持つ。 $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する基質はO-ニトロフェノール- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドであつてこれはこの酵素によつて作用を受けると無色から黄色に変化する。

(2) エシエリキア及び若干のシゲラは $\beta$ -グルクロニダーゼを持つ。 $\beta$ -グルクロニダーゼに対する基質は5-プロモ-4-クロロ-3-インドイル- $\beta$ -グルクロニドであり、これはこの酵素の作用を受けると青色に変る。

(3) シトロバクター、クレブシエラ、エンテロバクター及びセラチアはピロリドニルメプテダーゼ活性をもつ。この酵素の基質はL-ピロリドニル- $\beta$ -4-メトキシナフタルアミドであつてこの酵素に作用されると、ファストガーネットGBCの添加により赤色に変化する生成物を産生する。

#### 操 作

O-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド、5-プロモ-4-クロロ-3-インドイル- $\beta$ -グルクロニド及びL-ピロリドニル- $\beta$ -

4-メトキシナフタルアミドをそれぞれ100/100で含む100mlの溶液で綿球を含浸させ、次に風乾する。

この綿球を腸内菌科に属すると考えられる少数のコロニーの検出に使用する。この綿球を2滴の水で濡らせ37℃のインキュベーター中で60分間恒温保持する。全ての色の変化を観察し、次に1滴のファストガーネットGBC(シアノカンブラー)塩溶液(100/100水溶液)を綿球に添加し、この後の色の変化を全て注意する。生じうるいくつかの可能性がある。

色	説 明
1. 黄色、ファストガーネット添加後赤/褐色	$\beta$ -ガラクトシダーゼ及びピロリドニルメプテダーゼが存在(シトロバクター、クレブシエラ、エンテロバクター又はセラチアが考えられる)
2. 青色、ファストガーネット添加後赤/紫色	$\beta$ -グルクロニダーゼとピロリドニルメプテダーゼが存在(恐らく腸内菌科の菌ではない)

色	説 明
3. 緑色、ファストガーネット添加後赤/褐色(緑は黄色と青色との組合せである)	$\beta$ -グルクロニダーゼと $\beta$ -ガラクトシダーゼとピロリドニルメプテダーゼが存在(恐らく腸内菌科ではない)
4. 色の変化なし、ファストガーネット添加後赤色	ピロリドニルメプテダーゼのみ存在(セラチアが考えられる)
5. 黄色、ファストガーネット添加後赤色を現せず	$\beta$ -ガラクトシダーゼのみ存在(アリゾナと考えられる)
6. 青色、ファストガーネット添加後赤色を現せず	$\beta$ -グルクロニダーゼのみ存在(シゲラと考えられる)
7. 緑色、ファストガーネット添加後赤色を現せず	$\beta$ -ガラクトシダーゼと $\beta$ -グルクロニダーゼのみ存在(エシエリキアコリと考えられる)
8. 色の変化なし、ファストガーネット添加後も色の変化なし	(サルモネラ、シゲラ、プロテウス又はプロビデンシアと考えられる)

多くの場合に臨床微生物学者は培養物がサルモネラとシゲラを含むかどうかを知ることに関心があるのでこの試験は極めて有用である。この本発明方法は迅速なスクリーニングを可能にする。